

DOCKET NO.: 212289US0PCT

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

IN RE APPLICATION OF: GUNJI Yoshiya et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP00/02295

INTERNATIONAL FILING DATE: April 7, 2000

FOR: L-AMINO ACID-PRODUCING BACTERIUM AND METHOD FOR PRODUCING L-AMINO ACID

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119  
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<b><u>COUNTRY</u></b>	<b><u>APPLICATION NO</u></b>	<b><u>DAY/MONTH/YEAR</u></b>
Japan	11-103143	09 April 1999
Japan	11-169447	16 June 1999
Japan	11-368097	24 December 1999

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/JP00/02295. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,  
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
Surinder Sachar  
Registration No. 34,423



22850

(703) 413-3000  
Fax No. (703) 413-2220  
(OSMMN 1 97)



日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 26 APR 2000

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1999年 4月 9日

出 願 番 号  
Application Number:

平成11年特許願第103143号

出 願 人  
Applicant(s):

味の素株式会社

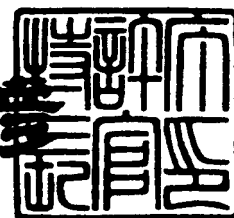
021274221

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月17日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3089368

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-6366

【提出日】 平成11年 4月 9日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 13/06

【発明の名称】 L-アミノ酸生産菌及びL-アミノ酸の製造法

【請求項の数】 7

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵  
技術研究所内

【氏名】 郡司 義哉

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵  
技術研究所内

【氏名】 安枝 寿

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵  
技術研究所内

【氏名】 杉本 慎一

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 03-3669-6571

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 L-アミノ酸生産菌及びL-アミノ酸の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌。

【請求項 2】 L-アミノ酸がL-リジンである請求項 1 記載のメチロフィラス属細菌。

【請求項 3】 ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性が増強された請求項 2 記載のメチロフィラス属細菌。

【請求項 4】 L-リジンによるフィードバック阻害を受けないジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNAと、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないアスパルトキナーゼをコードするDNAとが細胞内に導入されて形質転換されたことにより、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性が増強された請求項 3 記載のメチロフィラス属細菌。

【請求項 5】 メチロフィラス属細菌がメチロフィラス・メチロトロファスである請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の細菌。

【請求項 6】 請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のメチロフィラス属細菌を培地に培養し、該培養物中にL-アミノ酸を生産蓄積させ、該培養物からL-アミノ酸を採取することを特徴とするL-アミノ酸の製造法。

【請求項 7】 前記培地がメタノールを主たる炭素源とすることを特徴とする請求項 6 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は微生物工業に関連したものであり、詳しくは、発酵法によるL-アミノ酸の製造法、及び同製造法に用いる微生物に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

L-リジン、L-グルタミン酸、L-スレオニン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-バリン及びL-フェニルアラニン等のアミノ酸は、ブレビバクテリ

ウム属、コリネバクテリウム属、バチルス属、エシェリヒア属、ストレプトミセス属、シュードモナス属、アースロバクター属、セラチア属、ペニシリウム属、キャンディダ属等に属する微生物を用いた発酵法により工業生産されている。これらの微生物は、生産性を向上させるために、自然界から分離した菌株または該菌株の人工変異株が用いられている。また、組換えDNA技術によりL-グルタミン酸の生合成酵素を増強することによって、L-グルタミン酸の生産能を増加させる種々の技術が開示されている。

【0003】

上記のような微生物の育種や製造法の改良により、L-アミノ酸の生産性はかなり高まってはいるが、今後の需要の一層の増大に応えるためには、さらに安価かつ効率的なL-アミノ酸の製造法の開発が求められている。

【0004】

ところで、従来、安価に大量に入手可能な発酵原料であるメタノールから発酵法によりアミノ酸を製造する方法としては、アクロモバクター属およびシュードモナス属（特公昭45-25273号公報）、プロタミノバクター属（特開昭49-125590号公報）、プロタミノバクター属及びメタノモナス属（特開昭50-25790号公報）、マイクロサイラス属（特開昭52-18886号公報）、メチロバチルス属（特開平4-91793号公報）、バチルス属（特開平3-505284号公報）などに属する微生物を用いる方法が知られている。

【0005】

しかし、これまでメチロフィラス属細菌を用いてL-アミノ酸を製造することは知られていない。また、組換えDNAを用いたメチロフィラス属細菌の形質転換方法として、EP 0 035 831 A、EP 0 037 273 A、EP 0 066 994 Aが知られているが、メチロフィラス属細菌のアミノ酸の生産性の改善に組換えDNA技術が適用された例は知られていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規なL-アミノ酸生産菌及び同生産菌を用いたL-アミノ酸の製造法を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、メチロフィラス属細菌がL-アミノ酸の製造に適していることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち本発明は、以下のとおりである。

- (1) L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌。
- (2) L-アミノ酸がL-リジンである(1)のメチロフィラス属細菌。
- (3) ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性が増強された(2)のメチロフィラス属細菌。
- (4) L-リジンによるフィードバック阻害を受けないジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNAと、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないアスパルトキナーゼをコードするDNAとが細胞内に導入されて形質転換されたことにより、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性が増強された(3)のメチロフィラス属細菌。
- (5) メチロフィラス属細菌がメチロフィラス・メチロトロファスである(1)～(4)のいずれかの細菌。
- (6) 前記(1)～(5)のいずれかに記載のメチロフィラス属細菌を培地に培養し、該培養物中にL-アミノ酸を生産蓄積させ、該培養物からL-アミノ酸を採取することを特徴とするL-アミノ酸の製造法。
- (7) 前記培地がメタノールを主たる炭素源とすることを特徴とする(6)の方法。

【0009】

尚、本明細書において「L-アミノ酸生産能」とは、本発明の微生物を培地に培養したときに培地中に有意な量のL-アミノ酸を蓄積する能力をいう。

【0010】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。



本発明の微生物は、L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌である。本発明のメチロフィラス属細菌としては、例えばメチロフィラス・メチロトロファス (*Methylophilus methylotrophus*) AS1株 (NCIMB10515) 等が挙げられる。メチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (NCIMB10515) は、ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・アンド・マリン・バクテリア (National Collections of Industrial and Marine Bacteria、住所 NCIMB Ltd., Torry Research Station 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, United Kingdom) から入手可能である。

## 【0011】

本発明により生産されるL-アミノ酸としては、L-リジン、L-グルタミン酸、L-スレオニン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-トリプトファン、L-フェニルアラニン、L-チロシン等が挙げられる。

## 【0012】

L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌は、メチロフィラス属細菌の野生株にL-アミノ酸生産能を付与することにより取得され得る。L-アミノ酸生産能を付与するには、栄養要求性変異株、L-アミノ酸アナログ耐性株、又は代謝制御変異株の取得、L-アミノ酸生合成系酵素遺伝子が増強された組換え株の創製等、従来、コリネ型細菌又はエシェリヒア属細菌等の育種に採用されてきた方法を適用することができる (アミノ酸発酵第77~100頁参照)。

## 【0013】

例えば、L-リジン生産菌は、L-ホモセリン、又はL-スレオニン及びL-メチオニンを要求する変異株 (特公昭48-28078号、特公昭56-6499号)、イノシトールまたは酢酸を要求する変異株 (特開昭55-9784号、特開昭56-8692号)、又はオキサリジン、リジンヒドロキサメート、S-(2-アミノエチル)-システイン、 $\gamma$ -メチルリジン、 $\alpha$ -クロロカプロラクタム、DL- $\alpha$ -アミノ- $\epsilon$ -カプロラクタム、 $\alpha$ -アミノ-ラウリルラクタム、アスパラギン酸-アナログ、スルファ剤、キノイド、N-ラウロイルロイシンに耐性を有する変異株として育種することができる。

## 【0014】

また、L-グルタミン酸生産菌はオレイン酸要求変異株等として、L-スレオニン生産菌は $\alpha$ -アミノ- $\beta$ -ヒドロキシ吉草酸耐性変異株として、L-ホモセリン生産菌はL-スレオニン要求変異株又はL-フェニルアラニンアナログ耐性変異株として、L-フェニルアラニン生産菌は、L-チロシン要求変異株として、L-イソロイシン生産菌はL-ロイシン要求変異株として、L-プロリン生産菌は、L-イソロイシン要求変異株として、育種することができる。

## 【0015】

メチロフィラス属細菌から変異株を得るための変異処理としては、紫外線照射、またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。また、メチロフィラス属細菌の自然突然変異株を選択することによっても、L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌を得ることができる。

次に、L-アミノ酸生合成系酵素遺伝子の増強によってL-アミノ酸生産能を付与又は増強する方法を、以下に例示する。

## 【0016】

## 〔L-リジン〕

L-リジン生産能は、例えば、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性を増強することによって付与することができる。

メチロフィラス属細菌のジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性を増強するには、ジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子断片及びアスパルトキナーゼをコードする遺伝子断片を、メチロフィラス属細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型ベクターと連結して組み換えDNAを作製し、これをメチロフィラス属細菌の宿主に導入して形質転換すればよい。形質転換株の細胞内のジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子及びアスパルトキナーゼをコードする遺伝子のコピー数が上昇する結果、これらの酵素の活性が増強される。以下、ジヒドロジピコリン酸合成酵素をDDPS、アスパルトキナーゼをAK、アスパルトキナーゼIIIをAKIIIと略すことがある。

## 【0017】

DDPSをコードする遺伝子及びAKをコードする遺伝子の供与微生物としては、メ

チロフィラス属に属する微生物中でDDPS活性及びAK活性を発現することができる微生物であれば、いかなる微生物でも使用できる。微生物は、野生株及びそれから誘導した変異株のいずれでもよい。具体的にはE. coli (エシェリヒア・コリ(Escherichia coli)) K-12株及びメチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (NCIM B10515) 等が挙げられる。エシェリヒア属細菌由来のDDPSをコードする遺伝子 (dapA, Richaud, F. et al. J. Bacteriol., 297 (1986)) 及びAKIIIをコードする遺伝子 (lysC, Cassan, M., Parsot, C., Cohen, G.N. and Patte, J.C., J. Biol. Chem., 261, 1052(1986)) は、いずれも塩基配列が明らかにされているので、これらの遺伝子の塩基配列に基づいてプライマーを合成し、E. coli K-12等の微生物の染色体DNAを鋳型とするPCR法により、これらの遺伝子を取得することが可能である。以下、E. coli由来のdapA及びlysCを例として説明するが、本発明に用いる遺伝子は、これらに限定されるものではない。

#### 【0018】

本発明に用いるDDPS及びAKは、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないものであることが好ましい。E. coli由来の野生型DDPSはL-リジンによるフィードバック阻害を受けることが知られており、E. coli由来の野生型AKIIIはL-リジンによる抑制及びフィードバック阻害を受けることが知られている。したがって、メチロフィラス属細菌に導入するdapA及びlysCは、それぞれL-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するDDPS及びAKIIIをコードするものであることが好ましい。以下、L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するDDPSを「変異型DDPS」、変異型DDPSをコードするDNAを「変異型dapA」と呼ぶことがある。また、L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するE. coli由来のAKIIIを「変異型AKIII」、変異型AKIIIをコードするDNAを「変異型lysC」と呼ぶことがある。

尚、本発明においては、DDPS及びAKは必ずしも変異型である必要はない。例えば、コリネバクテリウム属細菌由来のDDPSはもともとL-リジンによるフィードバック阻害を受けないことが知られている。

#### 【0019】

E. coli由来の野生型dapAの塩基配列を配列番号1に、同塩基配列によってコ

ードされる野生型DDPSのアミノ酸配列を配列番号2に例示する。また、E. coli由来の野生型lysCの塩基配列を配列番号3に、同塩基配列によってコードされる野生型AKIIIのアミノ酸配列を配列番号4に例示する。

L-リジンによるフィードバック阻害を受けない変異型DDPSをコードするDNAとしては、配列番号2に示すアミノ酸配列において118位のヒスチジン残基がチロシン残基に置換された配列を有するDDPSをコードするDNAが挙げられる。また、L-リジンによるフィードバック阻害を受けない変異型AKIIIをコードするDNAとしては、配列番号4に示すアミノ酸配列において352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換された配列を有するAKIIIをコードするDNAが挙げられる。

#### 【0020】

遺伝子のクローニングに使用されるプラスミドとしては、エシェリア属細菌等の微生物において複製可能なものであればよく、具体的には、pBR322、pTWV228、pMW119、pUC19等が挙げられる。

#### 【0021】

また、メチロフィラス属細菌で機能するベクターとは、例えばメチロフィラス属細菌で自律複製出来るプラスミドである。具体的には、広宿主域ベクターであるRSF1010及びその誘導体、例えばpAYC32 (Chistorerdov, A.Y., Tsygankov, Y. D. Plasmid, 1986, 16, 161-167)、あるいはpMFY42 (gene, 44, 53(1990))、pRP301、pTB70 (Nature, 287, 396, (1980))等が挙げられる。

#### 【0022】

dapA及びlysCとメチロフィラス属細菌で機能するベクターを連結して組み換えDNAを調製するには、dapA及びlysCを含むDNA断片の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T4 DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。dapA及びlysCは、それぞれ別個のベクターに搭載してもよく、同一のベクターに搭載してもよい。

#### 【0023】

変異型DDPSをコードする変異型dapA及び変異型AKIIIをコードする変異型lysCを含むプラスミドとして、広宿主域プラスミドRSFD80が知られている (W095/160

42号)。同プラスミドで形質転換されたE. coli JM109株は、AJ12396と命名され、同株は1993年10月28日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-13936として寄託され、1994年11月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4859の受託番号のもとで寄託されている。RSFD80は、AJ12396株から、公知の方法によって取得することができる。

#### 【0024】

RSFD80に含まれている変異型dapAは、配列番号1に示す野生型dapAの塩基配列において塩基番号597のCがTに変化した配列を有し、それによって、コードされる変異型DDPSは、配列番号2に示すアミノ酸配列において118位のヒスチジン残基がチロシン残基に置換された配列を有する。また、RSFD80に含まれている変異型lysCは、配列番号3に示す野生型lysCの塩基配列において塩基番号1638のCがT変化した配列を有し、それによって、コードされる変異型AKIIIは、配列番号4に示すアミノ酸配列において352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換された配列を有する。

#### 【0025】

上記のように調製した組換えDNAをメチロフィラス属細菌に導入するには、十分な形質転換効率が得られる方法ならば、いかなる方法を用いてもよいが、例えば、エレクトロポレーション法 (Canadian Journal of Microbiology, 43, 197(1997)) が挙げられる。

#### 【0026】

DDPS活性及びAK活性の増強は、dapA及びlysCをメチロフィラス属細菌の染色体DNA上に多コピー存在させることによって達成できる。メチロフィラス属細菌の染色体DNA上にdapA及びlysCを多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペッティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーティッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、dapA及び／又はlysCをトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。いずれの方法によっても形質転換株内のdapA及lysCのコピー数が上昇する結果、DDPS活

性及びAK活性が増幅される。

【0027】

DDPS活性及びAK活性の増幅は、上記の遺伝子増幅による以外に、dapA及lysCのプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換することによっても達成される（特開平1-215280号公報参照）。たとえば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、tacプロモーター、ラムダファージのP<sub>R</sub>プロモーター、P<sub>L</sub>プロモーター、tetプロモーター、amyEプロモーター、spacプロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。これらのプロモーターへの置換により、dapA及lysCの発現が強化されることによってDDPS活性及びAK活性が増幅される。発現調節配列の増強は、dapA及lysCのコピー数を高めることと組み合わせてもよい。

【0028】

遺伝子断片とベクターを連結して組換えDNAを調製するには、遺伝子断片の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T4 DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。DNAの切断、連結、その他、染色体DNAの調製、PCR、プラスミドDNAの調製、形質転換、プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの設定等の方法は、当業者によく知られている通常の方法を採用することができる。これらの方法は、Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)等に記載されている。

DDPS及びAKの増強に加えて、他のL-リジン生合成に関与する酵素を増強してもよい。そのような酵素としては、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ（以上、W096/40934号参照）、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（特開昭60-87788号）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（特公平6-102028号）、ジアミノピメリン酸エピメラーゼ遺伝子等のジアミノピメリン酸経路の酵素、あるいはホモアコニット酸ヒドラターゼ遺伝子等のアミノアジピン酸経路の酵素等が挙げられる。

【0029】

さらに、本発明の微生物は、L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下または欠損していてもよい。L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素としては、ホモセリンデヒドロゲナーゼがある（WO 95/23864参照）。

#### 【0030】

上記のL-リジン生合成に関与する酵素の活性を増強する手法は、以下に示す他のアミノ酸についても同様に適用することができる。

#### 【0031】

##### 〔L-グルタミン酸〕

メチロフィラス属細菌へのL-グルタミン酸生産能は、例えば、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ（特開昭61-268185号）、グルタミンシンターゼ、グルタミン酸シンターゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ（特開昭62-166890号、特開昭63-214189号）、アコニット酸ヒドラターゼ（特開昭62-294086号）、クエン酸シンターゼ（特開昭62-201585号、特開昭63-119688号）、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（特開昭60-87788号、特開昭62-55089号）、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、ホスホエノールピルビン酸シンターゼ、エノラーゼ、ホスホグリセロムターゼ、ホスホグリセリン酸キナーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、フルトースビスリン酸アルドラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ（特開昭63-102692号）、グルコースリン酸イソメラーゼ、グルタミン-オキソグルタル酸アミノトランスフェラーゼ（WO99/07853）等の酵素をコードするDNAを導入することによって、付与することができる。

#### 【0032】

さらに、本発明の微生物は、L-グルタミン酸の生合成経路から分岐してL-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下または欠損していてもよい。L-グルタミン酸の生合成経路から分岐してL-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素としては、 $\alpha$ ケトグルタル酸デ

ヒドロゲナーゼ ( $\alpha$  KGDH)、イソクエン酸リアーゼ、リン酸アセチルトランスフェラーゼ、酢酸キナーゼ、アセトヒドロキシ酸シンターゼ、アセト乳酸シンターゼ、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、1-ピロリンデヒドロゲナーゼ等がある。

## 【0033】

## 〔L-スレオニン〕

L-スレオニン生産能は、例えば、スレオニンオペロンを含有した組換えプラスミド（特開昭 55-131397号公報、特開昭59-31691号公報、特開昭56-15696号公報、および特表平3-501682号公報参照）でメチロフィラス属細菌を形質転換することにより、付与又は増強することができる。

また、L-スレオニンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を有するスレオニンオペロン（特公平1-29559号公報）、ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子（特開昭60-012995号）、又はホモセリンキナーゼ及びホモセリンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子（特開昭61-195695号）を増強することによっても、生産性を付与又は増強することができる。

## 【0034】

さらに、アスパラギン酸によるフィードバック阻害を解除する変異を有する変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードするDNAを導入することによって、L-スレオニン生産能を向上させることができる。

## 【0035】

## 〔L-バリン〕

L-バリンの生産能の付与は、例えば、制御機構が実質的に解除されたL-バリン生合成系遺伝子をメチロフィラス属細菌に導入することによって行うことができる。また、エシェリヒア属に属する微生物が保持するL-バリン生合成系遺伝子の制御機構が実質的に解除されるような変異を導入してもよい。

## 【0036】

L-バリン生合成系遺伝子としては、例えばE. coliの *ilvGMEDA* オペ



ロンが挙げられる。尚、i l v A 遺伝子がコードするスレオニンデアミナーゼは、L-イソロイシン生合成系の律速段階であるL-スレオニンから2-ケト酪酸への脱アミノ化反応を触媒する。したがって、L-バリン合成系の反応を効率よく進行させるためには、スレオニンデアミナーゼ活性を発現しないオペロンを用いることが好ましい。このようなスレオニンデアミナーゼ活性を発現しない i l v G M E D A オペロンとしては、スレオニンデアミナーゼ活性を失うような変異が i l v A に導入された、又は i l v A が破壊された i l v G M E D A オペロン、あるいは i l v A が欠失した i l v G M E D オペロンが挙げられる。

【0037】

また、i l v G M E D A オペロンは、L-バリン及び／又はL-イソロイシン及び／又はL-ロイシンによるオペロンの発現調節（アテニュエーション）を受けるので、生成するL-バリンによる発現抑制を解除するために、アテニュエーションに必要な領域が除去又は変異されていることが好ましい。

上記のような、スレオニンデアミナーゼ活性を発現せず、アテニュエーションが解除された i l v G M E D A オペロンは、野生型 i l v G M E D A オペロンを変異処理し、または遺伝子組換え技術を用いて改変することにより得られる（以上、WO96/06926参照）。

【0038】

〔L-ロイシン〕

L-ロイシンの生産能の付与または増強は、例えば、上記L-バリン生産に必要な性質に加えて、制御機構が実質的に解除されたL-ロイシン生合成系遺伝子をエシェリヒア属に属する微生物に導入することによって行われる。また、エシェリヒア属に属する微生物が保持するL-ロイシン生合成系遺伝子の制御機構が実質的に解除されるような変異を導入してもよい。このような遺伝子として、例えば、L-ロイシンによる阻害が実質的に解除された l e u A 遺伝子が挙げられる。

【0039】

〔L-イソロイシン〕

L-イソロイシンは、例えば、E. coli由来のL-スレオニンによる阻害が実

質的に解除されたアスパルトキナーゼ I-ホモセリンデヒドロゲナーゼ I をコードする *thrA* 遺伝子を含む *thrABC* オペロンと、L-イソロイシンによる阻害が実質的に解除されたスレオニンデアミナーゼをコードする *ilvA* 遺伝子を含みかつアテニュエーションに必要な領域が除去された *ilvGMEDA* オペロンとを導入することにより、L-イソロイシン生産性を付与することができる（特開平 8-47397 参照）。

【0040】

〔その他のアミノ酸〕

〔L-スレオニン〕

〔L-バリン〕

L-トリプトファン、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-スレオニン及びL-イソロイシンは、メチロフィラス属細菌のホスホエノールピルビン酸の生産能を上昇させることによって、生合成が強化され得る（WO 97/08333）。

【0041】

L-フェニルアラニン及びL-チロシンは、脱感作型コリスミン酸ムターゼ-プレフェン酸デヒドラターゼ（CM-PDT）遺伝子（特開平 5-236947 号、特開昭 62-130693 号公報参照）、脱感作型 DS（3-デオキシ-D-アラビノヘプツロン酸-7-リン酸シンターゼ）遺伝子（特開平 5-236947 号、特開昭 61-124375 号公報参照）を増強することによって、生産性が向上する。

また、L-トリプトファンは、脱感作型アントラニル酸合成酵素をコードする遺伝子を含むトリプトファンオペロン（特開昭 57-71397 号、特開昭 62-244382 号、米国特許第 4,371,614）を増強することによって、生産性が向上する。

【0042】

上記のようにして得られる L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌を培地に培養し、該培養物中に L-アミノ酸を生産蓄積させ、該培養物から L-アミノ酸を採取することにより、L-アミノ酸を製造することができる。本発明

で用いられる培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じてその他の有機微量成分を含む培地であれば、天然培地、合成培地のいずれでも用いられる。

【0043】

メタノールを主たる炭素源として用いると、L-アミノ酸を安価に製造することができる。メタノールは、主たる炭素源として用いる場合は、培地中に0.05～30%添加する。窒素源としては硫酸アンモニウムなどを培地に添加して用いる。これらの他に、通常、リン酸カリウム、リン酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガンなどの微量成分が少量添加される。

【0044】

培養は、振とう培養又は通気攪拌培養などの好気条件下、pH5～9、温度24～37℃に保持して行われ、通常24～120時間で終了する。

培養物からのL-リジンの採取は、通常イオン交換樹脂法、沈殿法、その他の公知の方法を組み合わせるにより実施できる。

【0045】

#### 【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【0046】

#### <1>メチロフィラス属細菌への変異型lysC及び変異型dapAの導入

変異型lysC及び変異型dapAは、これらを含む公知のプラスミドRSFD80 (W095/16042号参照) を用いてメチロフィラス属細菌に導入した。RSFD80は、RSF1010の誘導体である広宿主域ベクタープラスミドpAYC32 (Chistorerdov, A.Y., Tsyganov, Y.D. Plasmid, 1986, 16, 161-167) に由来するプラスミドpVIC40 (W090/04636国際公開パンフレット、特表平3-501682号公報) のテトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーター (tetP) の下流に、tetPに対して転写方向が正方向となるようにE. coli由来の変異型dapA及び変異型lysCがこの順序で配置されている。この変異型dapAは、118位のヒスチジン残基がチロシン残基に置換された変異型DDPSをコードしている。また、前記変異型lysCは、352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換された変異型AKIIIをコードしている。

【0047】

RSFD80は、以下に示すようにして構築された。プラスミドpdapAS24上にある変異型dapAをpVIC40のテトラサイクリン耐性遺伝子プロモーターの下流に連結し、図1に示す様にしてRSF24Pを得た。次に、このRSF24Pと、変異型lysCを含むpLLC<sup>\*80</sup>から、変異型dapA及び変異型lysCを有するプラスミドRSFD80を図2の様にして作製した。すなわち、pVIC40はスレオニンオペロンを含んでいるが、RSFD80ではこのスレオニンオペロンが変異型dapAを含むDNA断片及び変異型lysCを含むDNA断片と置換されている。

## 【0048】

RSFD80プラスミドで形質転換された*E. coli* JM109株は、AJ12396と命名され、同株は、1993年10月28日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-13936として寄託され、1994年11月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4859の受託番号のもとで寄託されている。

## 【0049】

*E. coli* AJ1239株を、ストレプトマイシンを20mg/L含む30mlのLB培地で30℃で12時間培養して得た菌体から、Wizard<sup>R</sup> Plus Midipreps DNA Purification System(プロメガ社より市販)を用いてRSFD80プラスミドを精製した。

## 【0050】

上記のようにして得られたRSFD80プラスミドを、エレクトロポレーション法(Canadian Journal of Microbiology, 43, 197(1997))によりメチロフィラス・メチロトロファスAS1株(NCIMB10515)に導入した。なお、対照として、RSFD80プラスミドを作製する際に用いたpVIC40プラスミドよりスレオニンオペロンをコードするDNA領域を削除してベクター部分のみを持つpRSプラスミド(特表平3-501682号公報参照)を、RSFD80と同様にしてAS1株に導入した。

## 【0051】

<2> *E. coli*由来の変異型lysC及び変異型dapAを保持するメチロフィラス属細菌のAKIII活性

RSFD80プラスミドを保持するメチロフィラス・メチロトロファスAS1株(以下、「AS1/RSFD80」と略すことがある)と、pRSプラスミドを保持するメチロフィラス・メチロトロファスAS1株(以下、「AS1/pRS」と略すことがある)より、無

細胞抽出液を調製し、AK活性を測定した。無細胞抽出液（粗酵素液）は次のようにして調製した。AS1/RSFD80およびAS1/pRS株を、ストレプトマイシン20mg/Lを含む下記組成の121培地に植菌し、37℃で34時間振とう培養し、集菌した。培地のpHは水酸化ナトリウム水溶液または塩酸で調整した。培地は各成分を溶解した後120℃15分間の蒸気滅菌を行った。メタノールは、メンブレンフィルター（ミリポア社製、0.45  $\mu$ m）で除菌した後、蒸気滅菌した培地に添加した。

## 【0052】

（121培地の組成）

メタノール	2%
リン酸二カリウム	0.12%
リン酸一カリウム	0.062%
塩化カルシウム六水塩	0.005%
硫酸マグネシウム	0.02%
塩化ナトリウム	0.01%
塩化第三鉄	1.0mg/L
硫酸アンモニウム	0.3%
硫酸銅 5 水塩	5 $\mu$ g/L
硫酸マンガン 5 水塩	10 $\mu$ g/L
モリブデンナトリウム 2 水塩	10 $\mu$ g/L
ホウ酸	10 $\mu$ /L
硫酸亜鉛	70 $\mu$ g/L
塩化コバルト	5 $\mu$ g/L、

（pH7.0）

## 【0053】

上記のようにして得られた菌体を、0℃の条件下で0.2% KClで洗浄し、10mM  $\text{MgSO}_4$ 、0.8M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ および0.03M  $\beta$ -メルカプトエタノールを含む20mMリン酸カリウム緩衝液（pH7）に懸濁し、超音波処理（0℃、200W、10分）で菌体を破碎した。菌体破碎液を0℃の条件下で、3,300rpmで30分間遠心し、上清をとってこれに80%飽和になるように硫酸アンモニウムを添加し、0℃で1時間放

置した後遠心し、ペレットを10mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.8M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ および0.03M  $\beta$ -メルカプトエタノールを含む20mMリン酸カリウム緩衝液 (pH7) に溶解した。

## 【0054】

AK活性の測定はスタットマンらの方法 (Stadtman, E. R., Cohen, G. N., Le Bras, G., and Robichon-Szulmajster, H., J. Biol. Chem., 236, 2033(1961)) に従った。すなわち、下記組成の反応液を30℃で45分インキュベートし、 $\text{FeCl}_3$ 溶液 (2.8N HCl: 0.4ml, 12%TCA: 0.4ml, 5%  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ /0.1N HCl: 0.7ml) を加えて発色させ、これを遠心後、上清の540nmでの吸光度を測定した。活性は1分間に生成するヒドロキサム酸の量で表示 (1U=1 $\mu$ mol/分) した。モル吸光係数は600とした。なお、反応液からアスパラギン酸カリウムをのぞいたものをブランクとした。酵素活性を測定する際、酵素反応液中に種々の濃度のL-リジンを加え、L-リジンによる阻害の度合いを調べた。結果を表1に示した。

## 【0055】

(反応液組成)

reaction mixture <sup>*1</sup>	0.3ml
ヒドロキシルアミン溶液 <sup>*2</sup>	0.2ml
0.1Mアスパラギン酸カリウム (pH7.0)	0.2ml
酵素液	0.1ml
水 (バランス)	計 1ml

\*1: 1M Tris-HCl (pH8.1) 9ml, 0.3M  $\text{MgSO}_4$  0.5ml, 0.2M ATP (pH7.0) 5ml

\*2: 8Mヒドロキシルアミン溶液を直前にKOHで中和したもの

## 【0056】

## 【表1】

表1

菌株	AK活性 (比活性 <sup>*1</sup> )	L-リジン5mM存在 時の比活性	阻害解除度 <sup>*2</sup> (%)
AS1/pRS	7.93	9.07	114

AS1/RSFD80 13.36

15.33

115

\*1 : nmol/分/mgタンパク質

\*2 : L-リジン5mM存在時の活性保持率

【0057】

表1に示すように、RSFD80プラスミドの導入によりAK活性が約1.7倍に上昇した。また、RSFD80プラスミドにコードされるE. coli由来のAKはL-リジンにより阻害が完全に解除されていることが確認された。また、AS1株が元来保持するAKは、L-リジン単独では阻害を受けないことがわかった。尚、本発明者らは、AS1株由来のAKは、L-リジンとL-スレオニンが反応液中に各2mMづつ存在するときに、100%阻害されることを発見している（協奏阻害）。

【0058】

<3>E. coli由来の変異型lysC及び変異型dapAを保持するメチロフィラス属細菌によるL-リジンの製造

次に、AS1/RSFD80およびAS1/pRS株をストレプトマイシン20mg/Lおよび炭酸カルシウム3%を含む121培地に植菌し、37℃で34時間振とう培養した。培養終了後、菌体を遠心分離により除去し、培養上清に含まれるL-リジン濃度をアミノ酸分析計（日本分光製、高速液体クロマトグラフィー）で定量した。結果を表2に示す。

【0059】

【表2】

表2

菌株	L-リジン塩酸塩の生産量 (g/L)
AS1/pRS	0
AS1/RSFD80	0.3

【 0 0 6 0 】

【発明の効果】

本発明により、L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌及び同細菌を用いたL-アミノ酸の製造法が提供される。本発明の方法によれば、メタノールを原料としてL-アミノ酸を製造することが可能となる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 味の素株式会社 (Ajinomoto Co., Inc.)

<120> L-アミノ酸生産菌及びL-アミノ酸の製造法

<130> P-6366

<141> 1999-04-09

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

【 0 0 6 1 】

<210> 1

<211> 1197

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (272)..(1147)

<400> 1



ccaggcgact gtcttcaata ttacagccgc aactactgac atgacgggtg atggtgttca 60  
 caattccacg gcgatcggca cccaacgcag tgatcaccag ataatgtgtt gcgatgacag 120  
 tgtcaaactg gttattcctt taaggggtga gttgttctta aggaaagcat aaaaaaaca 180  
 tgcatacaac aatcagaacg gttctgtctg cttgctttta atgccatacc aaacgtacca 240  
 ttgagacact tgtttgcaca gaggatggcc c atg ttc acg gga agt att gtc 292

Met Phe Thr Gly Ser Ile Val

1

5

gcg att gtt act ccg atg gat gaa aaa ggt aat gtc tgt cgg gct agc 340  
 Ala Ile Val Thr Pro Met Asp Glu Lys Gly Asn Val Cys Arg Ala Ser

10

15

20

ttg aaa aaa ctg att gat tat cat gtc gcc agc ggt act tcg gcg atc 388  
 Leu Lys Lys Leu Ile Asp Tyr His Val Ala Ser Gly Thr Ser Ala Ile

25

30

35

gtt tct gtt ggc acc act ggc gag tcc gct acc tta aat cat gac gaa 436  
 Val Ser Val Gly Thr Thr Gly Glu Ser Ala Thr Leu Asn His Asp Glu

40

45

50

55

cat gct gat gtg gtg atg atg acg ctg gat ctg gct gat ggg cgc att 484  
 His Ala Asp Val Val Met Met Thr Leu Asp Leu Ala Asp Gly Arg Ile

60

65

70

ccg gta att gcc ggg acc ggc gct aac gct act gcg gaa gcc att agc 532  
 Pro Val Ile Ala Gly Thr Gly Ala Asn Ala Thr Ala Glu Ala Ile Ser

75

80

85

ctg acg cag cgc ttc aat gac agt ggt atc gtc ggc tgc ctg acg gta 580  
 Leu Thr Gln Arg Phe Asn Asp Ser Gly Ile Val Gly Cys Leu Thr Val

90

95

100

acc cct tac tac aat cgt ccg tcg caa gaa ggt ttg tat cag cat ttc 628  
 Thr Pro Tyr Tyr Asn Arg Pro Ser Gln Glu Gly Leu Tyr Gln His Phe

105

110

115

aaa gcc atc gct gag cat act gac ctg ccg caa att ctg tat aat gtc 676

Lys Ala Ile Ala Glu His Thr Asp Leu Pro Gln Ile Leu Tyr Asn Val	
120	125
ccg tcc cgt act ggc tgc gat ctg ctc ccg gaa acg gtg ggc cgt ctg	724
Pro Ser Arg Thr Gly Cys Asp Leu Leu Pro Glu Thr Val Gly Arg Leu	
140	145
gcg aaa gta aaa aat att atc gga atc aaa gag gca aca ggg aac tta	772
Ala Lys Val Lys Asn Ile Ile Gly Ile Lys Glu Ala Thr Gly Asn Leu	
155	160
acg cgt gta aac cag atc aaa gag ctg gtt tca gat gat ttt gtt ctg	820
Thr Arg Val Asn Gln Ile Lys Glu Leu Val Ser Asp Asp Phe Val Leu	
170	175
ctg agc ggc gat gat gcg agc gcg ctg gac ttc atg caa ttg ggc ggt	868
Leu Ser Gly Asp Asp Ala Ser Ala Leu Asp Phe Met Gln Leu Gly Gly	
185	190
cat ggg gtt att tcc gtt acg act aac gtc gca gcg cgt gat atg gcc	916
His Gly Val Ile Ser Val Thr Thr Asn Val Ala Ala Arg Asp Met Ala	
200	205
cag atg tgc aaa ctg gca gca gaa gaa cat ttt gcc gag gca cgc gtt	964
Gln Met Cys Lys Leu Ala Ala Glu Glu His Phe Ala Glu Ala Arg Val	
220	225
att aat cag cgt ctg atg cca tta cac aac aaa cta ttt gtc gaa ccc	1012
Ile Asn Gln Arg Leu Met Pro Leu His Asn Lys Leu Phe Val Glu Pro	
235	240
aat cca atc ccg gtg aaa tgg gca tgt aag gaa ctg ggt ctt gtg gcg	1060
Asn Pro Ile Pro Val Lys Trp Ala Cys Lys Glu Leu Gly Leu Val Ala	
250	255
acc gat acg ctg cgc ctg cca atg aca cca atc acc gac agt ggt cgt	1108
Thr Asp Thr Leu Arg Leu Pro Met Thr Pro Ile Thr Asp Ser Gly Arg	
265	270
	275

gag acg gtc aga gcg gcg ctt aag cat gcc ggt ttg ctg taaagtttag 1157

Glu Thr Val Arg Ala Ala Leu Lys His Ala Gly Leu Leu

280

285

290

ggagattiga tggcittactc tgttcaaaaag tcgcgccctgg 1197

【 0 0 6 2 】

<210> 2

<211> 292

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 2

Met Phe Thr Gly Ser Ile Val Ala Ile Val Thr Pro Met Asp Glu Lys

1

5

10

15

Gly Asn Val Cys Arg Ala Ser Leu Lys Lys Leu Ile Asp Tyr His Val

20

25

30

Ala Ser Gly Thr Ser Ala Ile Val Ser Val Gly Thr Thr Gly Glu Ser

35

40

45

Ala Thr Leu Asn His Asp Glu His Ala Asp Val Val Met Met Thr Leu

50

55

60

Asp Leu Ala Asp Gly Arg Ile Pro Val Ile Ala Gly Thr Gly Ala Asn

65

70

75

80

Ala Thr Ala Glu Ala Ile Ser Leu Thr Gln Arg Phe Asn Asp Ser Gly

85

90

95

Ile Val Gly Cys Leu Thr Val Thr Pro Tyr Tyr Asn Arg Pro Ser Gln

100

105

110

Glu Gly Leu Tyr Gln His Phe Lys Ala Ile Ala Glu His Thr Asp Leu

115

120

125

Pro Gln Ile Leu Tyr Asn Val Pro Ser Arg Thr Gly Cys Asp Leu Leu

130

135

140

Pro Glu Thr Val Gly Arg Leu Ala Lys Val Lys Asn Ile Ile Gly Ile  
 145 150 155 160  
 Lys Glu Ala Thr Gly Asn Leu Thr Arg Val Asn Gln Ile Lys Glu Leu  
 165 170 175  
 Val Ser Asp Asp Phe Val Leu Leu Ser Gly Asp Asp Ala Ser Ala Leu  
 180 185 190  
 Asp Phe Met Gln Leu Gly Gly His Gly Val Ile Ser Val Thr Thr Asn  
 195 200 205  
 Val Ala Ala Arg Asp Met Ala Gln Met Cys Lys Leu Ala Ala Glu Glu  
 210 215 220  
 His Phe Ala Glu Ala Arg Val Ile Asn Gln Arg Leu Met Pro Leu His  
 225 230 235 240  
 Asn Lys Leu Phe Val Glu Pro Asn Pro Ile Pro Val Lys Trp Ala Cys  
 245 250 255  
 Lys Glu Leu Gly Leu Val Ala Thr Asp Thr Leu Arg Leu Pro Met Thr  
 260 265 270  
 Pro Ile Thr Asp Ser Gly Arg Glu Thr Val Arg Ala Ala Leu Lys His  
 275 280 285  
 Ala Gly Leu Leu  
 290

【 0 0 6 3 】

<210> 3

<211> 2147

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (584)..(1930)

<400> 3

tcgaagtgtt tctgtagtgc ctgccaggca gcggtctgcg ttggattgat gtttttcatt 60  
 agcaatactc ttctgatitit gagaattgtg actttggaag attgttagcgc cagtcacaga 120  
 aaaatgtgat ggtttttagtg ccgttagcgt aatgttgagt gtaaaccctt agcgcagtga 180  
 agcattttatt agctgaacta ctgaccgcca ggagtggatg aaaaatccgc atgaccccat 240  
 cgttgacaac cgccccgctc accctttatt tataaatgta ctacctgcgc tagcgcaggc 300  
 cagaagaggc gcgttgccca agtaacgggtg ttggaggagc cagtcctgtg ataacacctg 360  
 aggggggtgca tcgccgaggt gattgaacgg ctggccacgt tcatcatcgg ctaagggggc 420  
 tgaatccctt gggttgtcac cagaagcgtt cgcagtcggg cgtttcgcaa gtgggtggagc 480  
 acttctgggt gaaaatagta gcgaagtatc gctctgcgcc caccgtctt ccgctcttcc 540  
 cttgtgccaa ggctgaaaat ggatcccctg acacgaggta gtt atg tct gaa att 595

Met Ser Glu Ile

1

gtt gtc tcc aaa ttt ggc ggt acc agc gta gct gat ttt gac gcc atg 643  
 Val Val Ser Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asp Phe Asp Ala Met  
 5 10 15 20  
 aac cgc agc gct gat att gtg ctt tct gat gcc aac gtg cgt tta gtt 691  
 Asn Arg Ser Ala Asp Ile Val Leu Ser Asp Ala Asn Val Arg Leu Val  
 25 30 35  
 gtc ctc tcg gct tct gct ggt atc act aat ctg ctg gtc gct tta gct 739  
 Val Leu Ser Ala Ser Ala Gly Ile Thr Asn Leu Leu Val Ala Leu Ala  
 40 45 50  
 gaa gga ctg gaa cct ggc gag cga ttc gaa aaa ctc gac gct atc cgc 787  
 Glu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Arg Phe Glu Lys Leu Asp Ala Ile Arg  
 55 60 65  
 aac atc cag ttt gcc att ctg gaa cgt ctg cgt tac ccg aac gtt atc 835  
 Asn Ile Gln Phe Ala Ile Leu Glu Arg Leu Arg Tyr Pro Asn Val Ile  
 70 75 80

cgt gaa gag att gaa cgt ctg ctg gag aac att act gtt ctg gca gaa 883  
 Arg Glu Glu Ile Glu Arg Leu Leu Glu Asn Ile Thr Val Leu Ala Glu  
 85 90 95 100  
 gcg gcg gcg ctg gca acg tct ccg gcg ctg aca gat gag ctg gtc agc 931  
 Ala Ala Ala Leu Ala Thr Ser Pro Ala Leu Thr Asp Glu Leu Val Ser  
 105 110 115  
 cac ggc gag ctg atg tcg acc ctg ctg ttt gtt gag atc ctg cgc gaa 979  
 His Gly Glu Leu Met Ser Thr Leu Leu Phe Val Glu Ile Leu Arg Glu  
 120 125 130  
 cgc gat gtt cag gca cag tgg ttt gat gta cgt aaa gtg atg cgt acc 1027  
 Arg Asp Val Gln Ala Gln Trp Phe Asp Val Arg Lys Val Met Arg Thr  
 135 140 145  
 aac gac cga ttt ggt cgt gca gag cca gat ata gcc gcg ctg gcg gaa 1075  
 Asn Asp Arg Phe Gly Arg Ala Glu Pro Asp Ile Ala Ala Leu Ala Glu  
 150 155 160  
 ctg gcc gcg ctg cag ctg ctc cca cgt ctc aat gaa ggc tta gtg atc 1123  
 Leu Ala Ala Leu Gln Leu Leu Pro Arg Leu Asn Glu Gly Leu Val Ile  
 165 170 175 180  
 acc cag gga ttt atc ggt agc gaa aat aaa ggt cgt aca acg acg ctt 1171  
 Thr Gln Gly Phe Ile Gly Ser Glu Asn Lys Gly Arg Thr Thr Thr Leu  
 185 190 195  
 ggc cgt gga ggc agc gat tat acg gca gcc ttg ctg gcg gag gct tta 1219  
 Gly Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Leu Leu Ala Glu Ala Leu  
 200 205 210  
 cac gca tct cgt gtt gat atc tgg acc gac gtc ccg ggc atc tac acc 1267  
 His Ala Ser Arg Val Asp Ile Trp Thr Asp Val Pro Gly Ile Tyr Thr  
 215 220 225  
 acc gat cca cgc gta gtt tcc gca gca aaa cgc att gat gaa atc gcg 1315  
 Thr Asp Pro Arg Val Val Ser Ala Ala Lys Arg Ile Asp Glu Ile Ala

230	235	240	
ttt gcc gaa gcg gca gag atg gca act ttt ggt gca aaa gta ctg cat			1363
Phe Ala Glu Ala Ala Glu Met Ala Thr Phe Gly Ala Lys Val Leu His			
245	250	255	260
ccg gca acg ttg cta ccc gca gta cgc agc gat atc ccg gtc ttt gtc			1411
Pro Ala Thr Leu Leu Pro Ala Val Arg Ser Asp Ile Pro Val Phe Val			
265	270	275	
ggc tcc agc aaa gac cca cgc gca ggt ggt acg ctg gtg tgc aat aaa			1459
Gly Ser Ser Lys Asp Pro Arg Ala Gly Gly Thr Leu Val Cys Asn Lys			
280	285	290	
act gaa aat ccg ccg ctg ttc cgc gct ctg gcg ctt cgt cgc aat cag			1507
Thr Glu Asn Pro Pro Leu Phe Arg Ala Leu Ala Leu Arg Arg Asn Gln			
295	300	305	
act ctg ctc act ttg cac agc ctg aat atg ctg cat tct cgc ggt ttc			1555
Thr Leu Leu Thr Leu His Ser Leu Asn Met Leu His Ser Arg Gly Phe			
310	315	320	
ctc gcg gaa gtt ttc ggc atc ctc gcg cgg cat aat att tcg gta gac			1603
Leu Ala Glu Val Phe Gly Ile Leu Ala Arg His Asn Ile Ser Val Asp			
325	330	335	340
tta atc acc acg tca gaa gtg agc gtg gca tta acc ctt gat acc acc			1651
Leu Ile Thr Thr Ser Glu Val Ser Val Ala Leu Thr Leu Asp Thr Thr			
345	350	355	
ggc tca acc tcc act ggc gat acg ttg ctg acg caa tct ctg ctg atg			1699
Gly Ser Thr Ser Thr Gly Asp Thr Leu Leu Thr Gln Ser Leu Leu Met			
360	365	370	
gag ctt tcc gca ctg tgt cgg gtg gag gtg gaa gaa ggt ctg gcg ctg			1747
Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu Gly Leu Ala Leu			
375	380	385	
gtc gcg ttg att ggc aat gac ctg tca aaa gcc tgc ggc gtt ggc aaa			1795

Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys Gly Val Gly Lys

390

395

400

gag gta ttc ggc gta ctg gaa ccg ttc aac att cgc atg att tgt tat 1843

Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg Met Ile Cys Tyr

405

410

415

420

ggc gca tcc agc cat aac ctg tgc ttc ctg gtg ccc ggc gaa gat gcc 1891

Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro Gly Glu Asp Ala

425

430

435

gag cag gtg gtg caa aaa ctg cat agt aat ttg ttt gag taaatactgt 1940

Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe Glu

440

445

atggcctgga agctatatatt cgggccgtat tgattttctt gtcactatgc tcatcaataa 2000

acgagcctgt actctgttaa ccagcgtctt tatcgagaaa taattgcctt taattttttt 2060

atctgcatct ctaattaatt atcgaaagag ataaatagtt aagagaaggc aaaatgaata 2120

ttatcagttc tgctcgcaaa ggaattc 2147

【 0 0 6 4 】

<210> 4

<211> 449

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 4

Met Ser Glu Ile Val Val Ser Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asp

1

5

10

15

Phe Asp Ala Met Asn Arg Ser Ala Asp Ile Val Leu Ser Asp Ala Asn

20

25

30

Val Arg Leu Val Val Leu Ser Ala Ser Ala Gly Ile Thr Asn Leu Leu

35

40

45

Val Ala Leu Ala Glu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Arg Phe Glu Lys Leu



50	55	60	
Asp Ala Ile Arg Asn Ile Gln Phe Ala Ile Leu Glu Arg Leu Arg Tyr			
65	70	75	80
Pro Asn Val Ile Arg Glu Glu Ile Glu Arg Leu Leu Glu Asn Ile Thr			
	85	90	95
Val Leu Ala Glu Ala Ala Ala Leu Ala Thr Ser Pro Ala Leu Thr Asp			
100	105	110	
Glu Leu Val Ser His Gly Glu Leu Met Ser Thr Leu Leu Phe Val Glu			
115	120	125	
Ile Leu Arg Glu Arg Asp Val Gln Ala Gln Trp Phe Asp Val Arg Lys			
130	135	140	
Val Met Arg Thr Asn Asp Arg Phe Gly Arg Ala Glu Pro Asp Ile Ala			
145	150	155	160
Ala Leu Ala Glu Leu Ala Ala Leu Gln Leu Leu Pro Arg Leu Asn Glu			
	165	170	175
Gly Leu Val Ile Thr Gln Gly Phe Ile Gly Ser Glu Asn Lys Gly Arg			
180	185	190	
Thr Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Leu Leu			
195	200	205	
Ala Glu Ala Leu His Ala Ser Arg Val Asp Ile Trp Thr Asp Val Pro			
210	215	220	
Gly Ile Tyr Thr Thr Asp Pro Arg Val Val Ser Ala Ala Lys Arg Ile			
225	230	235	240
Asp Glu Ile Ala Phe Ala Glu Ala Ala Glu Met Ala Thr Phe Gly Ala			
	245	250	255
Lys Val Leu His Pro Ala Thr Leu Leu Pro Ala Val Arg Ser Asp Ile			
260	265	270	
Pro Val Phe Val Gly Ser Ser Lys Asp Pro Arg Ala Gly Gly Thr Leu			
275	280	285	

Val Cys Asn Lys Thr Glu Asn Pro Pro Leu Phe Arg Ala Leu Ala Leu  
 290 295 300

Arg Arg Asn Gln Thr Leu Leu Thr Leu His Ser Leu Asn Met Leu His  
 305 310 315 320

Ser Arg Gly Phe Leu Ala Glu Val Phe Gly Ile Leu Ala Arg His Asn  
 325 330 335

Ile Ser Val Asp Leu Ile Thr Thr Ser Glu Val Ser Val Ala Leu Thr  
 340 345 350

Leu Asp Thr Thr Gly Ser Thr Ser Thr Gly Asp Thr Leu Leu Thr Gln  
 355 360 365

Ser Leu Leu Met Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu  
 370 375 380

Gly Leu Ala Leu Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys  
 385 390 395 400

Gly Val Gly Lys Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg  
 405 410 415

Met Ile Cys Tyr Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro  
 420 425 430

Gly Glu Asp Ala Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe  
 435 440 445

Glu

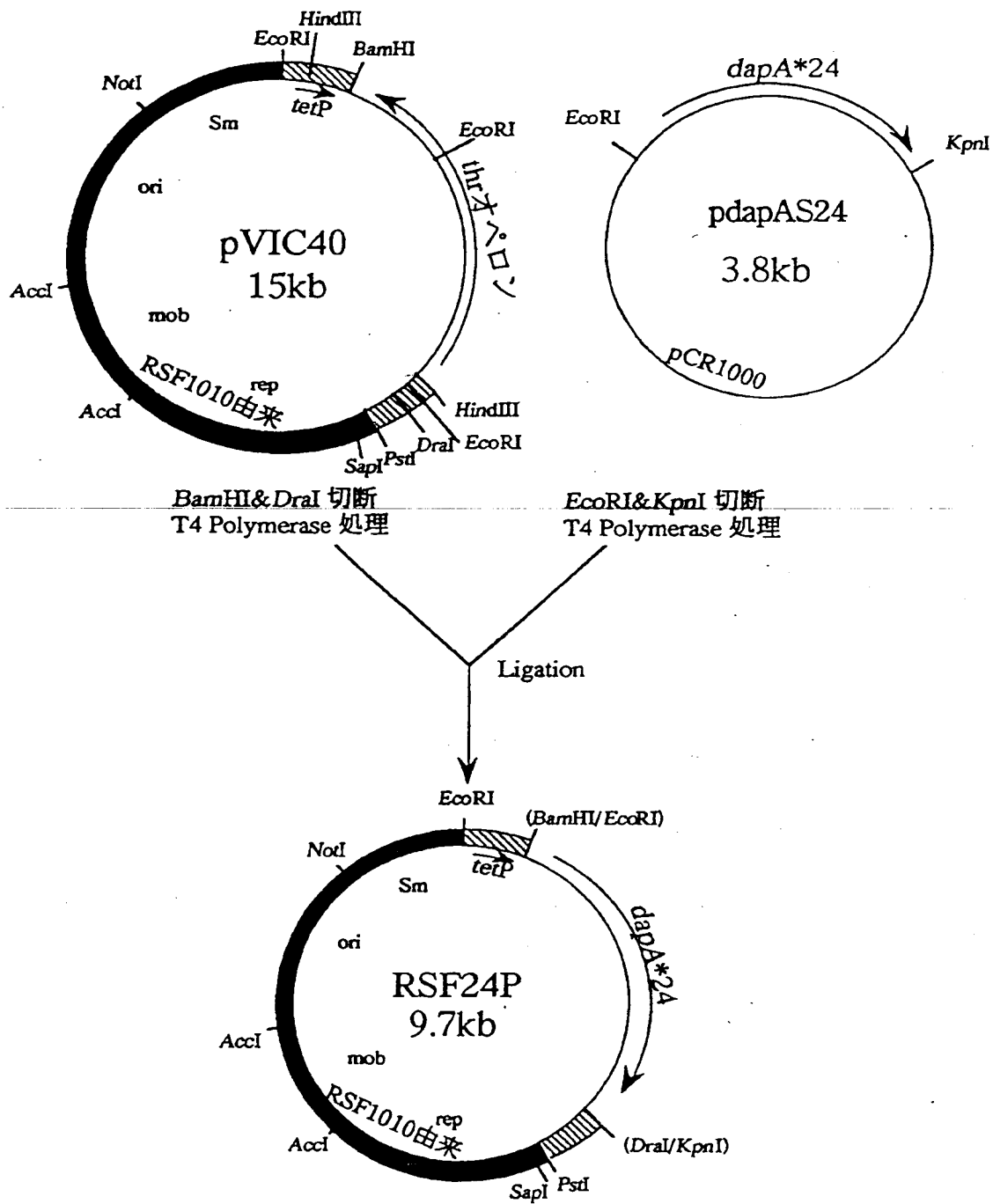
【図面の簡単な説明】

【図 1】 変異型dapAを有するプラスミドRSF24Pの製造工程を示す図。「dapA<sup>\*24</sup>」は、118位のヒスチジン残基がチロシン残基に置換された変異型DDPSをコード変異型dapAを表す。

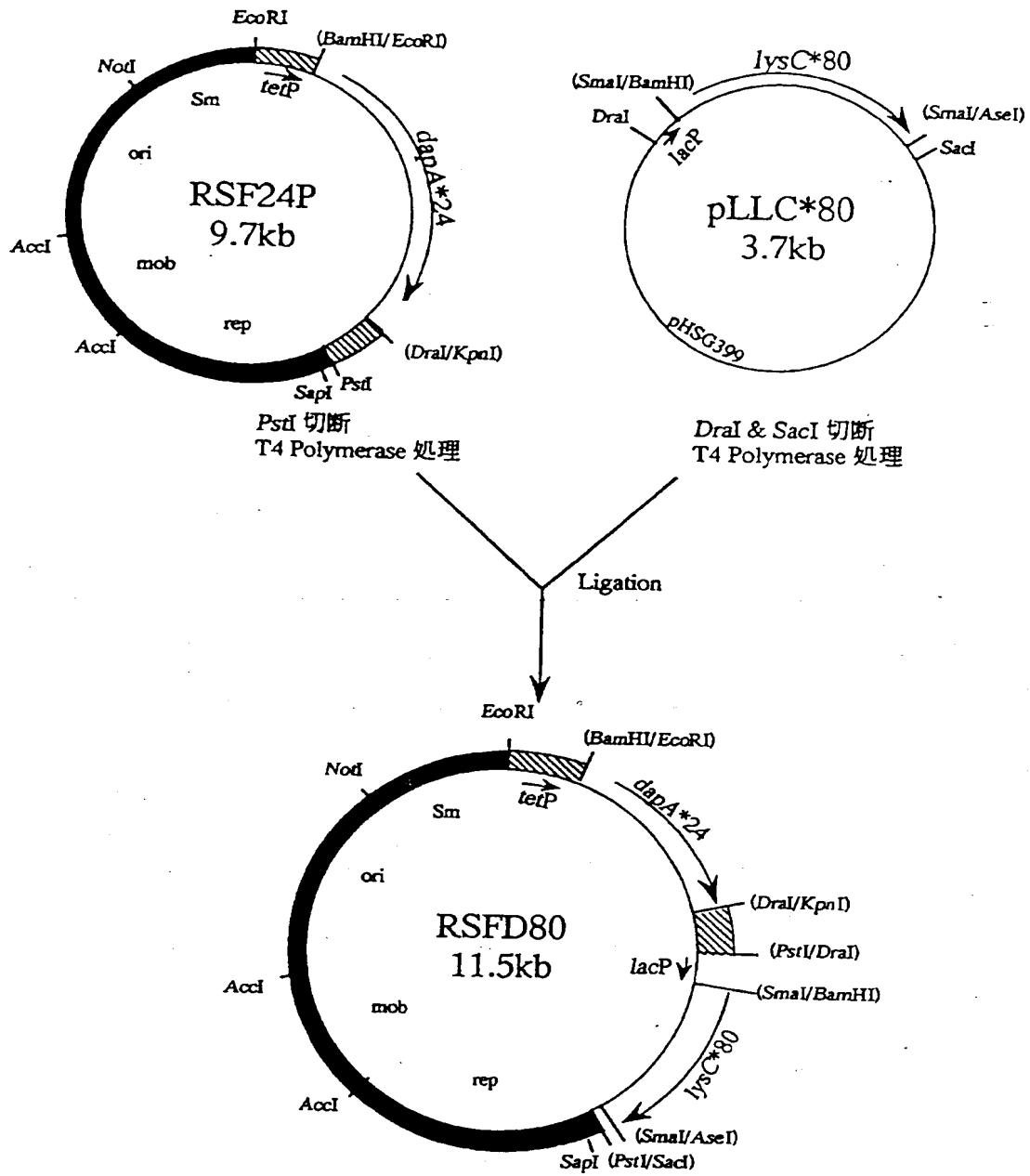
【図 2】 変異型dapA及び変異型lysCを有するプラスミドRSFD80の製造工程を示す図。「lysC<sup>\*80</sup>」は、352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換された変異型AKIIIをコード変異型lysCを表す。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 メタノールを主炭素源として発酵法によりL-アミノ酸を効率よく生産する微生物、及び同微生物を用いてL-アミノ酸を製造する方法を提供する。

【解決手段】 メタノールを主たる炭素源として生育することができ、かつ、L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌、例えば、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNAと、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないアスパルトキナーゼをコードするDNAとが細胞内に導入されて形質転換されたことにより、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性が増強されたメチロフィラス属細菌を、メタノールを主たる炭素源とする培地に培養し、該培養物中にL-リジン等のアミノ酸を生産蓄積させ、該培養物からL-アミノ酸を採取することにより、L-アミノ酸を製造する。

【選択図】 図2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号                    [000000066]

1. 変更年月日            1991年   7月   2日  
  [変更理由]            住所変更  
      住   所            東京都中央区京橋 1 丁目 15 番 1 号  
      氏   名            味の素株式会社